

養殖九孔細菌性疾病調查研究

李國誥、劉秉忠、黃之暘、吳韋毅

國立台灣海洋大學水產養殖學系

一、前言

台灣鮑魚 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 俗稱九孔或珍珠鮑魚，其除兼具食用與藥用價值外，同時亦具外銷潛力與競爭力，並成為我國輸出養殖水產品中主力之一。不過近年來相關九孔之繁養殖產業，陸續遭受病害侵襲，除造成養殖戶重大損失外，也嚴重危及產業永續發展；特別是於 2002 年發生之孵化稚貝大量落板，造成養殖戶無苗可養的窘況，而於 2003 年初爆發的養成貝大量斃死，更對產業形成如同雪上加霜的危害。連續 5 年來本研究室對養殖九孔進行養殖環境監測與相關疾病之調查研究，採樣之地點則包括宜蘭頭城、台東成功、高雄林園、屏東佳冬與離島金門及澎湖等。依據調查研究結果發現細菌性疾病 (bacterial diseases) 是影響九孔健康並造成大量死亡的主要原因。為此有必要對養殖環境與管理方式作通盤性的檢討，並從穩定環境菌相、降低病原攜入及徹底做好日常管理的環境監測做起。

二、養殖九孔常見細菌性疾病

(一) 九孔苗大量脫落

一般發生九孔幼苗大量落板並出現死亡的情形大約是在著苗後的第 7~14 天，觀察垂吊苗池中提供幼苗附著的聚乙烯 (PVC) 浪板，可以發現其上所附著的藻類以褐藻為主，與正常附苗浪板上著生的矽藻種類有明顯差異；並且其上不乏如石蓴 (*Ulva* spp.) 或絲狀藻等大型藻類，觸摸時具明顯黏滯感。以接種環刮取浪板表面生物膜進行培養，或直接將浪板剪下拓印於平面培養基 (TSA、BHIA 或 TCBS) 培養，皆可發現取自九孔苗大量落板與死亡苗池中的樣本，可以分離到大量的溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)；觀察菌株的出現比例、數量、成長速度與擴散現象，皆可發現在九孔幼苗發生落板與大量死亡的案例中，溶藻弧菌為環境中的優勢菌種。

(二) 養成貝足部潰瘍與囊腫

由現場採樣與攻擊實驗兩項結果得知，感染溶藻弧菌或腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 的九孔除會發生活力降低、攝食減少或甚至停止外，尚有足部肌肉潰瘍、產生膿胞病灶、足部肌肉與外套膜萎縮，以及肌肉白濁且水樣化的病變特徵。特別是在每年的 4~6 月間，都會有為數不少的養殖九孔出現上述的感染症狀，並造成明顯的死亡率。由攻擊實驗得知，將溶藻弧菌或腸炎弧菌的菌懸液注入健康的九孔肌肉與體腔中，亦分別造成類似的感染症狀，並有明顯的死亡率。

將溶藻弧菌或腸炎弧菌的細胞外產物 (Extracellular products; ECP) 經以疏水性交互作用層析管柱-快速蛋白液體層析儀 (Hydrophobic Interaction Chromatography-Fast Protein Liquid Chromatography, HIC-FPLC) 進行部分純化，將具蛋白分解酵素活性之收集液，隨後分別以 RESOURCE Q-FPLC 作進一步純化。並將具蛋白分解酵素活性之收集液經透析後，於 Mono Q-FPLC 進行部份純化。得之初步純化之蛋白分解酵素在經 SDS-PAGE 測定後，可發現溶藻弧菌或腸炎弧菌的蛋白質分解酵素分別為約 34 及 94 kDa 之蛋白分解酵素，推測本部分純化蛋白分解酵素可能是致死毒素，目前正進一步研究中。

將自現場採得之不同株溶藻弧菌於實驗室純化培養，並進行鑑定 (傳統與商業快速鑑定套組)、保種與相關攻擊試驗。在以菌液及其 ECP 進行的攻擊試驗中，發現所採得之 8 株溶藻弧菌，其中有一株之菌液及 ECP 對九孔具有明顯的致死性。分別以菌懸浮液與細胞外產物注射九孔成貝 (20 ± 2 g)，攻擊樣本出現足部肌肉水樣潰爛與囊腫，並具有明顯的致死性，LD₅₀ 分別為 3.16×10^5 cfu/g body weight 與 $0.9 \mu\text{g protein/g body weight}$ 。在 FPLC 上經由疏水性管柱層析，可得知造成九孔死亡的主要原因為一種蛋白質分解酵素 (protease)，同時此蛋白質分析酵素在不同 pH 值與鹽度下皆具明顯活性。

在 *in-vitro* 實驗中，將溶藻弧菌之 ECP 定量加入九孔血淋巴 (Haemolymph)，於不同時間作用下，再經由電泳與染色，可以發現 6 小時後九孔之血淋巴，即因受到蛋白質分解酵素作用降解；而在 *in-vivo* 實驗中，將菌株之 ECP 注入九孔體內，依不同時間抽取血淋巴進行電泳分析，也獲得相同結果。

(三) 養成貝褐環症

於 2001 年 8 月前往澎湖七美針對大量垂死九孔進行採樣，其症狀為失去活力與附著能力、腹足部肌肉顏色變淡與黏液分泌量降低，並且在殼貝內側具有明顯黃色物質堆積，殼層內緣尚出現珍珠質異常增生，於邊緣處時有缺刻與溶失現象。經分離、培養與初步鑑定，發現以 *V. alginolyticus* (45%) 及 *V. parahaemolyticus* (28%) 及 *V. carchariae* 為主；攻擊試驗中發現 *V. alginolyticus* 對九孔具有明顯的致死性，菌株對九孔半致死濃度分別為 3.07×10^4 、 3.26×10^5 及 1.78×10^5 ，但殼緣內側並不出現褐黃色堆積。分別將此三株菌株混合於洋菜瓊膠中，並定量投餵九孔，發現在長時間的投餵試驗下，*V. carchariae* 雖然並不造成個體的迅速死亡，但卻可在殼緣內側出現明顯的褐黃色環狀堆積。

三、環境菌相監測

廣義的環境監測應該同時包括了水質、生物相及微生物相，不過針對好發於九孔的細菌性疾病，在此狹義的定義僅包括了針對細菌進行的相關調查。依據不同養殖過程及階段，茲將環境監測區分為以下五個項目：

(一) 投餌用龍鬚菜菌相調查

將龍鬚菜先以滅菌 PBS 充分清洗，隨後將定量之龍鬚菜分別以完整、片段及研磨後等三種型式，投入固定體積之 PBS 中，進行震盪培養。並於固定時間採取培養液，經連續稀釋後，分別定量塗布於 TSA (含 2.5% NaCl) 及 TCBS 上；定溫下培養 24 小時計算菌落，將於 TSA 上生長菌落數量視作總菌量，而於選擇性培養基 TCBS 上生長菌落數則視作弧菌 (*Vibrio* spp.) 菌量。以此方式不但可以了解主要用於投餌養殖九孔餌料的龍鬚菜，其表面菌相組成種類與數量，進而作為餌料品質評估參考與相關管理建議，同時也比較不同來源與不同處理方式對其菌相組成種類與數量上的差異。

由龍鬚菜表面進行菌相調查，發現主要以弧菌屬 (*Vibrio*) 及氣單胞菌屬 (*Aeromonas*) 為主；其中自龍鬚菜表面所分離的溶藻弧菌、腸炎弧菌與 *V. carchariae*，不但為經常檢出菌株，在龍鬚菜藻體表面菌相數量中佔明顯比例，同時在攻擊與投餌實驗中，分別可造成九孔的體表潰瘍、囊腫、肌肉萎縮與在殼緣內側出現明顯黃色堆積，證實對九孔具較其他環境菌株明顯的致病 (死) 率。

調查發現多數養殖戶對於龍鬚菜的處理，僅侷限於投餌前以去除泥沙為目的的簡單漂洗，以及為方便九孔攝食所採取的切碎處理，但是如此方式不但無法徹底去除龍鬚菜表面所附著的菌體，同時由切碎藻體所滲出的液體，反倒成為滋養菌株 (特別是溶藻弧菌) 快速大量生長的主要營養來源。

(二) 養成貝體內菌相調查

於不同季節自養殖九孔腸道中分離細菌菌株，經過 TSA (含 2.5% NaCl) 與 TCBS 培養及生理生化特性鑑定，並以商業快速鑑定套組 API 20E 與 Biolog GN2 輔助鑑定。發現養殖九孔腸道菌相以 *Photobacterium damsela*, *Aeromonas hydrophila*, *V. alginolyticus*, *V. carcharia*, *V. hollisae*, *V. parahaemolyticus*, *V. spp.* 及 *Stenotrophomonas maltophilia* 為主，而在不同季節中，菌相並無明顯差異；但其中以弧菌屬中之溶藻弧菌及腸炎弧菌對九孔具有致病力。不過當水溫逐漸升高的 4 月以後，便可以發現弧菌屬的檢出比例明顯提高，其中尤以 *V. alginolyticus* 與 *V. parahaemolyticus* 為主。推測當水溫逐漸升高時，九孔的攝食率增加，而此時環境中的弧菌亦因漸升水溫而大量增殖，並在沿岸形成優勢的菌相，因而導致九孔腸道中弧菌偏高的檢出率。

分別以龍鬚菜 (*Gracilaria* sp.) 及人工配合飼料投餌九孔，並在持續投餌後進行九孔腸道菌相分析與鑑定。投餌龍鬚菜之九孔攝食情況較佳，並且水質污染情況較小；而投餌人工配合飼料之九孔除攝食意願較差，飼料容易在水中崩解外，也同時容易造成水質污染。投餌龍鬚菜與人工配合飼料之九孔，均可在腸道菌相分離出嗜水性氣單胞菌 (*A. hydrophila*)、溶藻弧菌、腸炎弧菌、*V. hollisae* 及其他弧菌與 *S. maltophilia*。投餌人工飼料之九孔腸道中嗜水性氣單胞菌之檢出率較高；而未經充分洗淨的龍鬚菜中除可檢出大量的溶藻弧菌與腸炎弧菌外，並且於投餌該種餌料之個體腸道與血淋巴中，亦可檢出相同菌種。

(三) 育成環境菌相調查

九孔養殖在早期多於潮間帶進行粗放式養殖，但因對沿岸生態存在深遠影響，因此移往陸地發展；近年來更因市場需求殷切，養殖業者紛紛採取高密度立體養殖方式，如此使養殖九孔除在技術密集與勞力密集外，也成為兼具資本密集的特殊養殖產業。不過當在固定體積的水體中，飼養更高密度的養殖生物時，便需要在維持環境狀態穩定上，投注更多的相關管理。特別是水質條件、疾病檢測與防治方面，因為在高密度飼養環境下，這些因子不但變動明顯快速，同時對於養殖生物所造成的影響，相形更加密切相關。針對九孔育成環境進行菌相調查，分別自養殖環境池水、池壁、池底層積物與個體進行採樣。池水分別以 0.45 與 0.22 μm 濾紙過濾，並將過濾液在連續稀釋後，定量塗布於 TSA (含 2.5 % NaCl) 與 TCBS 上，分別進行菌落計數與鑑定。池壁採樣分別觀察在不同養殖環境、管理方式與養殖階段，出現於池壁表面的生物種類，同時刮取附著物與藻類，進行鏡檢與相關菌相分離、培養與鑑定。

出現於養殖池環境中的生物組成，會隨季節、養殖環境狀態、管理條件與不同養殖階段，出現略為明顯的差異；一般而言，良好的養殖環境因為定期的日常管理，因此不易見到諸如管蟲、旋毛蟲、牡蠣、石蠶與大型藻類附生。大量存在於養殖環境中的附著生物，不但影響水流通路，造成高密度養殖環境中維生系統的負擔，同時也會迅速損耗養殖環境中水質的營養鹽組成，並在夜間消耗溶氧。此外經由實際採樣，發現這些大量滋生的附著生物，除本身會攜帶特定菌種外，同時當其死亡與腐敗時，也會造成養殖環境的優養化，進而讓環境中的總菌量明顯增加；尤其是對於部分如石蓴或海膜等大型藻類，其破碎或死亡後的藻體，往往會造成環境中溶藻弧菌的大量滋生，進而影響養殖九孔的健康。

(四) 繁殖用種貝菌相調查

現場所使用的繁殖用種貝，依據來源可區分為自沿海環境採集之野生個體，以及在養殖環境培育成熟個體兩大類；不過前者因為近年沿海環境破壞，資源日益枯竭，因此現今繁殖用種貝，多來自養殖場自行培育。挑選具有飽滿生殖巢的種貝，然後以塑膠籃集中蓄養，蓄養過程中偶爾會投餵少量龍鬚菜供其攝食；待個體穩定 3~4 天後開始進行繁殖。

分別自繁殖用種貝之體表黏液、肌肉、血淋巴、生殖巢、肝胰臟、精液、卵、繁殖用水及投餵餌料進行採樣，組織與藻體以定量研磨，黏液及體液則連續稀釋，塗布於 TSA (含 2.5 % NaCl) 及 TCBS 上培養，檢測總菌數與菌相。

針對投餵種貝所使用之龍鬚菜進行採樣，發現未經消毒與殺菌處理之藻體表面帶有大量弧菌。健康種貝之肌肉、血淋巴與生殖巢中無細菌檢出，但對於部分虛弱或體表出現病灶之個體，卻可於潰瘍處、血淋巴及生殖巢中檢出大量弧菌，數量上以溶藻弧菌為優勢種，其次則為 *V. carchariae*、*V. tubiashi* 與腸炎弧菌。針對以溫度刺激下排出生殖細胞之種貝，繁殖用水、進行黏液、精液、卵及混合受精卵採樣，發現皆可檢出大量溶藻弧菌，並且此菌株在攻擊試驗中對九孔具致死性。

(五) 育苗環境菌相調查

2001 年 10~11 月於東北角九孔繁殖場，發生稚貝在附著浪板後 7~10 天發生大量掉落並死亡現象。分別以刮取浪板附著物、養殖池壁及垂死之九孔稚貝充分研磨，培養於 TSA (含 2.5 % NaCl) 與 TCBS 上，經鑑定發現發生大量稚貝死亡的培育池中，菌相以 *V. alginolyticus* 及 *A. hydrophila* 為主。

針對附苗所使用的聚乙烯 (PVC) 浪板進行試驗，發現即使乾燥的浪板，經過浸泡於滅菌海水與 TSB 液態培養基中震盪培養，仍可檢出大量溶藻弧菌，因此推測未經充分洗淨消毒而使用的附苗浪板，也成為傳遞致病媒介的管道之一。

分別自台北縣貢寮鄉香蘭及宜蘭縣頭城之九孔繁養殖場採樣，除進行水質與藻相分析外，也針對九孔繁殖發苗之育苗池池水、池壁附著物與浪板表面進行採樣、細菌培養與鑑定；並以不同孔徑濾膜 (0.22 與 0.45 μ m) 過濾九孔苗池水，發現存在於水中的懸浮顆粒為攜帶與傳播細菌的主要媒介。發生九孔幼苗大量落板與死亡現象的養殖池池水中，檢出菌株以溶藻弧菌及嗜水性氣單胞菌為主，分別佔有檢出細菌種類的 63.6% (14/22) 及 22.7% (5/22)；其餘尚有少量之假單胞菌 (*Pseudomonas* sp.)、枯草桿菌 (*Bacillus* sp.) 與巴斯德氏菌 (*Pasteurella* sp.)。比對附苗狀況良好及貝苗發生大量脫落與死亡的苗池，可發現在菌相組成及比例上有明顯差異；其中後者於浪板、池水及池壁之菌相以溶藻弧菌為主 (圖 1~7)。



圖 1 2003 年初東北角的養成九孔發生大量斃死現象，個體足部肌肉僵硬且黑變，大規模的迅速死亡嚴重影響產業，並造成養殖戶莫大損失



圖 2 由 *Vibrio carchariae* 感染九孔所造成的褐環症，雖不致引發罹病個體迅速死亡，但出現於殼緣內側的褐黃色堆積，卻嚴重影響商品外觀及價值



圖 3 左為受到弧菌感染而產生的肌肉萎縮症狀的九孔個體，右為對照參考。罹患肌肉萎縮的個體不但毫無經濟價值，同時也成為傳播病原的媒介



圖 4 受到溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 感染的罹病九孔，主要特徵為足部肌肉囊腫，並呈現水樣性糜爛症狀



圖 5 受到弧菌感染的罹病九孔，主要特徵為足部肌肉白濁



圖 6 受到腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 感染的罹病九孔，主要特徵為明顯的足部肌肉囊腫

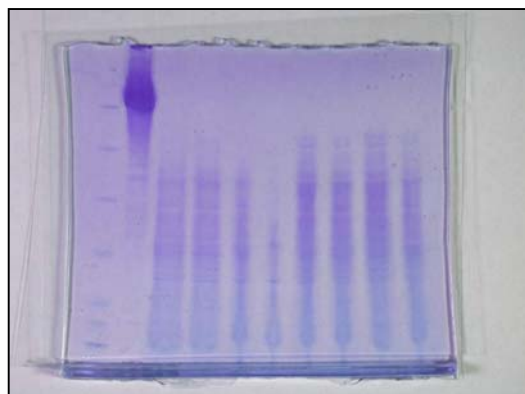


圖 7 將弧菌之細胞外產物與九孔血淋巴混合，在電泳下可明顯見到血淋巴被降解。Lane 1 為 STD marker，Lane 2 為九孔血淋巴，Lane 3~10 為混合細胞外產物與九孔血淋巴